



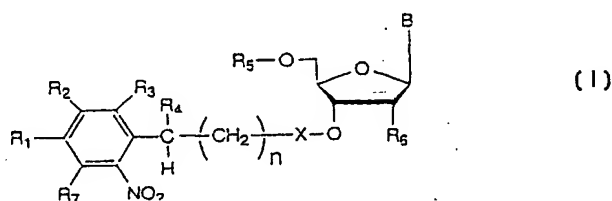
(3)

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07H 19/06, 19/16, C12Q 1/68</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/61594</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)</p>						
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01148</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 2000 (07.04.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">199 15 867.3</td> <td style="width: 33%;">8. April 1999 (08.04.99)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>100 03 631.7</td> <td>28. Januar 2000 (28.01.00)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIER, Markus [DE/DE]; Werderstrasse 42a, D-69120 Heidelberg (DE). HOHEISEL, Jörg [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 2, D-69168 Wies- loch (DE).</p> <p>(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber &amp; Schüssler, Trud- eringerstrasse 246, D-81825 München (DE).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </div> </div>			199 15 867.3	8. April 1999 (08.04.99)	DE	100 03 631.7	28. Januar 2000 (28.01.00)	DE
199 15 867.3	8. April 1999 (08.04.99)	DE						
100 03 631.7	28. Januar 2000 (28.01.00)	DE						

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES WITH PHOTO-UNSTABLE PROTECTIVE GROUPS

(54) Bezeichnung: NUCLEOSID-DERIVATE MIT PHOTOLABILEN SCHUTZGRUPPEN



(57) Abstract

The present invention relates to nucleoside derivatives with photo-unstable protective groups of general formula (I). The invention further relates to a method for producing said nucleosides, the use thereof and nucleic acid chips consisting thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I). Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser Nucleoside, deren Verwendung und daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen, Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung sowie daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

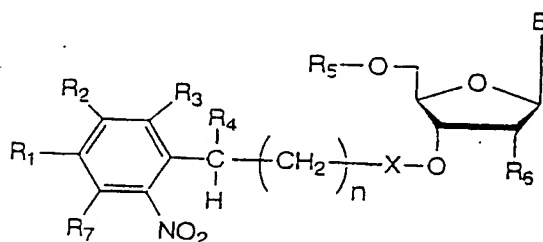
Photolabile Schutzgruppen für die Hydroxy- und Phosphatfunktionen in Nucleosiden bzw. Nucleotiden sind von Bedeutung, da sie sich für die lichtgesteuerte Parallel-Synthese von Oligonukleotiden auf einer soliden Trägeroberfläche eignen (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.). Hiermit können Oligonukleotide oder Nukleinsäure-Chips aufgebaut werden, die z.B. für eine effiziente Sequenzierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden können.

Bislang sind einzig photolithografische Herstellungsverfahren von DNA-Chips unter Verwendung von 3'-O-Phosphitamiden, die entsprechend die temporäre photolabile Schutzgruppe an der 5'-O-Position aufweisen, bekannt (WO-A-96/18634). Unter Verwendung dieser Nucleinsäurebausteine lassen sich DNA-Chips herstellen, wobei der Aufbau des Oligomers vom 3'- zum 5'-Ende erfolgt. Das fertiggestellte Oligomer ist somit über das 3'-O-Ende an der festen Phase verankert, das 5'-OH-Ende ist frei zugänglich. DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich für Hybridisierungsexperimente verwenden, aber nicht für bestimmte Enzymreaktionen (z.B. mit der DNA-Polymerase oder Ligase), die ein freies 3'-OH erfordern.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, 3'-photolabile Nucleoside und deren Derivate bereitzustellen und mit den daraus gewonnenen 3'-photolabilen Nucleosiden Nukleinsäure-Chips zu generieren, bei denen die über die lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind und somit Enzymreaktionen am 3'-Ende möglich machen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Nucleosid-Derivate der allgemeinen Formel (I) entsprechend Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Erfindungsgemäße Nucleosid-Derivate haben folgende Formel:



mit

- $R^1$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen
- $R^2$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- $R^3$  = H, Halogen,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- $R^4$  = H, Halogen,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- $R^5$  = H, Dimethoxytrityl oder eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe
- $R^6$  = H, OH, Halogen oder  $\Psi R^8$ , wobei  $\Psi$  = O oder S und  $R^8$  = Alkyl- oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphati-

scher Acylrest mit 2 bis 5 Atomen sowie eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe

$R^7$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

$n$  = 0 oder 1

$X$  =  $\text{SO}_2$ , OCO, OCS

$B$  = H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von  $B$  = Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine temporäre oder permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der O4-Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

Die Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylgruppe der Reste  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^7$  kann linear oder verzweigt sein, substituiert (insbesondere mit einem oder mehreren Halogenatomen) oder unsubstituiert sowie gesättigt oder ungesättigt sein. Zwischen den Resten kann eine Brückenverbindung bestehen, z.B. über eine Methylengruppe, so daß sich eine weitere Ringfunktion ergibt. Analoges gilt für die Axyl- oder Arylgruppe der Reste  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  oder  $R^7$ . Hier kommen als Substituenten neben Halogenatomen auch Alkylgruppen in Frage. Bevorzugte Alkylreste sind Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, n-Butyl-, iso-Propyl, tert-Butyl-. Bevorzugte Alkoxyreste sind die Methoxy-, Ethoxy- oder tert-Butoxygruppierung. Bevorzugte aliphatische Acylreste sind der Formylrest ( $-\text{CHO}$ ), Acetylrest ( $-\text{CO}-\text{CH}_3$ ), Propionylrest ( $-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_5$ ) oder Butyrylrest ( $-\text{CO}-\text{C}_3\text{H}_7$ ). Bevorzugte (Hetero)Arylreste sind der Phenyl-, Thienyl-, Thiophenyl-, Furyl-, Furanyl-, Pyranyl-, Pyrrolyl-, Imidazolyl-, Pyrazolyl-, Pyridyl-, Pyrazinyl-, Pyrimidinyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-, Thiazolyl-, Oxazolyl-, Indolyl-, Pyrrolinyl-, Imidazolinyl-, Pyrazolinyl-, Thiazolinyl-, Triazolyl-, Tetrazolylgruppe sowie sich daraus ergebende annellierte Ringe.

Vorzugsweise stellt  $R^4$  H oder einen Methylrest dar. Im Falle von  $R^4 \neq H$  sind die Substituenten  $R^1 - R^3$  am Phenylring vorzugsweise Wasserstoffreste. Außerdem stellt im Falle von  $R^2 = OCH_3$ ,  $R^3$  vorzugsweise einen Wasserstoffrest dar.

In der Position  $R^5$  bedeutet "eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe" beispielsweise eine Phosphitamid-Gruppe, wie  $p\text{-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $p\text{-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$  oder  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ , wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl- oder Isopropylreste, bedeuten.

In der Position  $R^6$  bedeutet "eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe" ( $=R^8$ ) insbesondere H sowie die üblichen O-Alkyl-, O-Alkenyl-, O-Acetal- oder O-Silylether-Schutzgruppen. Bevorzugte Schutzgruppen sind O-Methyl- oder O-Ethylreste, O-Allylreste, O-Tetrahydropyranyl- bzw. O-Methoxytetrahydropyranyl-Reste sowie O-t-Butyldimethylsilyl-Reste.

Die an den Basen B ggf. permanent vorkommenden Schutzgruppen basieren vorzugsweise auf Acyl-Schutzgruppen. Bevorzugt sind vor allem Phenoxycetyl-, tert-Butylphenoxycetyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, Benzoyl-, Allyloxycarbonyl-, Phthaloyl-, Dansylethyloxycarbonyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl- oder Dimethylformamidino-Reste. Im Falle von Adenin, Cytosin und Guanin handelt es sich vorzugsweise um Phenoxycetyl-, tert-Butylphenoxycetyl-, Acetyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Gruppen zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen. Die  $O^6$ -Position von Guanin kann ggf. durch eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- geschützt sein. Ebenso kann die  $O^4$ -Position von Thymin oder Uracil eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- aufweisen.

Halogen bedeutet erfindungsgemäß F, Cl, Br, I, wobei die drei letztgenannten bevorzugt sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate ist beispielhaft in Fig. 2 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird. Die Erwähnung von bestimmten Halogen- und Alkylsubstitutionen schließt immer gleichwirkende Äquivalente ein, z.B. "Chlor-" schließt nicht aus, daß auch die entsprechenden Iod- oder Bromverbindungen einsetzbar sind. Ebensolches gilt für "Methyl-", das auch die entsprechenden anderen Niederalkylverbindungen, wie Ethyl-, Propyl- oder Butyl mit einschließt. Die Reste  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  und X haben die oben genannten Bedeutungen.

Die Herstellung beginnt mit der Präparation eines Acylierungsreagenzes. Hierzu wird auf Fig. 1 verwiesen. Ausgegangen wird hierfür bevorzugt von einem Chlorkohlensäureester (II, mit X = OCO), der sich beispielsweise gemäß der Vorschrift in WO-A-96/18634 oder gemäß nachfolgendem Beispiel 1 erhalten läßt. Analog ist ein gewünschter Chlorthiokohlensäureester (II, mit X = OCS) über die analoge Umsetzung mit Thiophosgen zugänglich. Das Acylierungsreagenz (IV) wird dann durch Umsetzung des Chlorkohlensäureesters (II, mit X = OCO) oder des Chlorthiokohlensäureesters (II, mit X = OCS) oder eines entsprechenden Sulfonylchlorid-Derivat (II, X = SO<sub>2</sub>) mit einer Verbindung (III), vorzugsweise N-Methylimidazol, generiert. Diese Reaktionen werden in einem polären organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen -10°C und + 10°C, vorzugsweise bei 0°C, durchgeführt. Vorzugsweise wird der Reaktion Molekularsieb zugesetzt und mit einem Überschuß an Verbindung (III), bevorzugt N-Methylimidazol, in bezug auf die eingesetzte Verbindung (II) gearbeitet: 1-10 Äquivalente, bevorzugt 2-5 Äquivalente. Alternativ zu N-Methylimidazol kann die Generation des Acylierungsreagenzes auch mittels anderer heterocyclischer Verbindungen (III), wie Pyridin, 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP), Triazol, Tetrazol oder Imidazol verlaufen.

Alternativ ist das Acylierungsreagenz (IV, Z = triflat) ausgehend von N,N-Carbonyldiimidazol (V, Y = CO) oder N,N-Thiocar-

bonyldiimidazol (V, Y = CS) nach Methylierung mit einem Methylierungsreagenz (VI), vorzugsweise Trifluormethansulfonsäuremethylester, und Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) zugänglich. Hierbei wird die Reaktion bevorzugt in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in Nitromethan oder einem Gemisch von Nitromethan und Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen -10 und +10°C, vorzugsweise 0°C, durchgeführt. Die Methylierung von (V) erfolgt beispielsweise gemäß Rapoport et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, S. 4856-4859. Nach erfolgter Methylierung wird der entsprechende Alkohol (VIII) zugesetzt und somit das Acylierungsmittel vom Imidazoliumtyp (IV, Z = triflat) in Form eines Triflatsalzes generiert. Werden bei der Methylierung von (V) als Methylierungsreagenz (VI) Methyljodid oder Meerweinsalze eingesetzt, können die Acylierungsreagenzien (IV) entsprechend in Form ihrer Iodid oder Tetrafluoroborat-Salze erzeugt werden. Die Umsetzung von Verbindung (V) mit dem entsprechenden Methylierungsmittel erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1:1 bis 1:10, bevorzugt im Verhältnis 1:2. Die Umsetzung der methylierten Form (VI) mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1:1 bis 1:10, ganz bevorzugt im Verhältnis 1:1 bis 1:2.

Das Acylierungsreagenz (IV) wird weiter mit einem ggf. geschützten Nucleosid (IX) umgesetzt. 5'-DMTr-geschützte Nucleoside der allgemeinen Formel (IX) sind beispielsweise käuflich erhältlich von den Firmen Proligo, Fluka, Sigma oder Aldrich.

Die Umsetzung des Acylierungsreagenz (IV) mit den geschützten Nucleosiden (IX) erfolgt vorzugsweise in Dichlormethan oder einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und einem polaren organischen Lösungsmittel ggf. in Gegenwart einer Base, wie Pyridin, N-Methylimidazol, 4,N,N-Dimethylaminopyridin, Ethyldiisopropylamin ( $\text{EtN}(\text{i-pr})_2$ ) oder Triethylamin, bei Temperaturen zwischen -60 und +25°C, bevorzugt 0°C. Als polares organisches Lösungsmittel wird vorzugsweise Dichlorethan, Nitromethan, DMF oder Pyridin eingesetzt. Das Mischungsverhältnis



von Dichlormethan zu dem polaren organischen Lösungsmittel unterliegt keiner Beschränkung. Vorzugsweise werden jedoch 1 bis 3 Vol.-Teile Dichlormethan pro Vol.-Teil polarem organischen Lösungsmittel eingesetzt. Bevorzugt wird eine Lösung des Acylierungsreagenz (IV) in Dichlormethan vorgelegt und das Nucleosid (IX), welches ebenso in Dichlormethan gelöst wurde, zugetropft. Das Molverhältnis von Acylierungsreagenz zu Nucleosid kann vorzugsweise zwischen 1:1 bis 5:1, bevorzugt bei 3:1, ganz bevorzugt bei 2:1 liegen, d.h. das Acylierungsreagenz wird bevorzugt im Überschuß verwendet. Die Konzentration des Nucleosids im Lösungsmittelgemisch unterliegt keiner Beschränkung. Sie liegt jedoch bevorzugt im Bereich von 0,1 bis 3,0 mmol pro 10 ml Lösungsmittel.

Nach erfolgter Umsetzung (bevorzugte Reaktionszeit: 1-12 Std.) kann das erhaltene Nucleosid-Derivat (X) isoliert werden. Danach erfolgt das Abspalten der 5'-Schutzgruppe am Nucleosidbestandteil durch Umsetzen mit bevorzugt Trichloressigsäure oder Toluolsulfonsäure, ggf. mit Camphersulfonsäure oder Dichloressigsäure in Dichlormethan. Es wird das Nucleosid-Derivat (XI) erhalten, das Formel (I) gehorcht.

Falls es gewünscht ist, kann an der 5'-Position des Nucleosid-Derivats (XI) eine Phosphitamid-Gruppe eingeführt werden. Dies geschieht beispielsweise durch die Umsetzung des Nucleosid-Derivats (XI) mit Bis(diisopropylamino) ( $\beta$ -cyanoethoxy) phosphin unter Zusatz eines leicht aciden Katalysators (beispielsweise Tetrazol, Pyridin-Hydrochlorid) oder durch Umsetzung des Nucleosidderivats mit Chlor-Diisopropylamino-2-cyanoethoxy)phosphin unter Zusatz einer Base (z.B. Diisopropylethylamin, N-Methylmorphin, Lutidin oder Collidin) und einem Lösungsmittel (z.B. THF, Dichlormethan). Dabei entsteht Verbindung (XII).

Der Vorteil die Umsetzung des geschützten Nucleosids mit einem milden Acylierungsreagenz durchzuführen, liegt in der Selektivität der Reaktion. Es werden quantitative Acylierungen der 3'-O-Position des Nucleosidbausteins ohne nachteilige Neben-

produktformation erhalten. Werden hierzu reaktivere Acylierungsreagenzien, wie z.B. der entsprechende Chlorkohlensäureester selbst, verwendet, tritt eine unkontrollierte Reaktion ein. Es werden eine große Anzahl von Nebenprodukten gebildet, d.h. es besteht hierbei keinerlei Selektivität für das gewünschte 3'-monoacylierte Produkt. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird das geschützte Nucleosid mit dem Acylierungsreagenz unter Zusatz von Molekularsieb durchgeführt. Mit Molekularsieb ist eine Steigerung der Selektivität für das gewünschte 3'-monoacylierte Produkt zu beobachten.

Die erfindungsgemäßen 3'-photolabilen Nucleoside können bei der photolithografischen Nukleinsäurechip-Synthese eingesetzt werden. Verfahren hierzu sind dem Fachmann ausreichend bekannt (z.B. Fodor et al., s.o). Ein geeignetes Verfahren hierzu ist beispielsweise auch in der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt. Dort wird zwar ein Verfahren gezeigt, das von 5'-photolabilen Nucleosiden ausgeht, aber die dort gezeigte Methodik läßt sich auf die Verwendung von 3'-photolabilen 5'-Phosphitamiden (gemäß Formel XII von Fig. 2) analog übertragen. Bei diesem Verfahren wird der bei der Chip-Synthese übliche Bestrahlungsschritt in Anwesenheit einer Base durchgeführt. Dieses Verfahren zur photolithografischen Biochip-Synthese bietet den Vorteil, daß eine effiziente Abspaltung von photolabilen Schutzgruppen stattfindet.

Unter einem Nucleinsäurechip sollen erfindungsgemäß auf einem Träger aufgebaute Biomoleküle, wie DNA oder RNA, sowie Nucleinsäureanaloge, wie PNA, LNA oder Chimären von diesen mit DNA, RNA oder untereinander verstanden werden.

Erfindungsgemäß ist jegliche(r) auf diesem Gebiet übliche Träger bzw. Matrix bei der Nucleinsäurechip-Herstellung einsetzbar. Dies sind insbesondere Glas, Folien bzw. Membranen aus Polypropylen, Nylon, Cellulose, Cellulosederivate (z.B. Celluloseacetat, Cellulose-Mischester), Polyethersulfonen, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenfluorid, Polyester,

Teflon oder Polyethylen. Die Trägeroberflächen können auch mit freien oder geschützten funktionellen Gruppen versehen sein, z.B. eine Amino-Gruppe, Hydroxyl-Gruppe, Carboxyl-Gruppe, Carbonyl-Gruppe, Thiol-, Amid- oder Phosphat-Gruppe tragen. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Trägeroberflächen eine Derivatisierung gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 53 242.3 auf.

Bei dem oben- genannten bevorzugten Verfahren zur photolithografischen Biochip-Synthese gemäß der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 werden die Schritte Kondensation, Oxidation und Capping wie üblich (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.) durchgeführt. Allerdings findet der erste Schritt der Synthese, nämlich die Bestrahlung, unter Zusatz von Basen, bevorzugt starken Basen, insbesondere nicht-nukleophilen Basen, statt, was in Zusammenwirken mit dem bei der Bestrahlung angewendeten Licht zu einer überraschend effektiven Abspaltung der Schutzgruppen führt. Als Basen eignen sich die dem Fachmann bekannten Basen, wie z.B. DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DBN (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en, Diisopropylethylamin, Pyridin, Piperidin, Triethylamin, Diisopropylamin, N-Methylmorpholin, 2,6-Lutidin, Collidin, N-Methylimidazol, Dabco, N,N,-Dimethylaminopyridin. Die Bestrahlung kann unter den üblichen Bedingungen stattfinden. Die Wellenlänge der Bestrahlung ist von der verwendeten Schutzgruppe abhängig. Die geeigneten Wellenlängen sind dem Fachmann bekannt. Die Menge an während der Bestrahlung anwesender Base variiert zwischen 0,01 M und 1,0 M und ist natürlich von der Basenstärke abhängig. So hat sich es sich bewährt 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 bis 0,5 M) DBU in Acetonitril, 0,03 bis 0,8 M (bevorzugt 0,05 M) Diisopropylethylamin in Acetonitril oder 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 M) Piperidin in Acetonitril zu verwenden.

Nucleinsäure-Chips, die unter Verwendung erfindungsgemäßer Nucleoside hergestellt worden sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß das fertiggestellte Oligomer mit der 5'-Position mit der festen Phase verbunden ist, das 3'-OH aber frei zugänglich

ist (vgl. Fig. 3). DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich sowohl für Hybridisierungsexperimente als auch für bestimmte Enzymreaktionen (z.B. DNA-Polymerase), die ein freies 3'-OH erfordern, verwenden. Somit haben Nucleinsäure-Chips (bevorzugt DNA-Chips), die mit dieser Strategie erzeugt wurden, einen weit größeren Anwendungsbereich, da mit diesen sowohl alle Experimente durchgeführt werden können wie mit den "üblichen" DNA-Chips, aber darüberhinaus noch hochparallel festphasengestützte Enzymreaktionen (z.B. cDNA-Synthese, Ligase-Reaktionen, reverse Transkription, PCR, multiplex-PCR) durchgeführt werden können. Damit erschließen sich neue Anwendungsgebiete (z.B. DNA-Computing, festphasengestützte Sequenzierung).

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Figuren beschrieben.

- Fig. 1: Herstellung eines Acylierungsreagenzes (allgemein)
- (a) Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X = \text{OCO}$
  - (b) Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X = \text{OCS}$
  - (c) Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X = \text{SO}_2$

- Fig. 2: Allgemeiner Synthesepfad erfindungsgemäßer 3'-photolabiler Nucleosid-Derivate

- Fig. 3-7: Synthesepfade der Verbindungen gemäß der Beispiele 1-16

- Fig. 8: Aufbau eines Oligonukleotids unter Verwendung 3'-O-photolabiler 5'-Phosphitamide gemäß Formel (I)

- Fig. 9: Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips, der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N,-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Auf der

Trägeroberfläche wurde die Sequenz dT<sub>9</sub> aufgebaut. Das dT<sub>9</sub> - Oligonukleotid ist mit seinem 5'-Ende auf der Oberfläche verankert, das 3'-OH steht für eine Enzymreaktion frei zur Verfügung. Das abgebildete Fluoreszenz-Image wurde nach Hybridisierung des Chips mit Cy5-markiertem dA<sub>16</sub> erhalten. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 10: Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips, der unter Verwendung von 3'-O-[6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N,-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Auf der Trägeroberfläche wurde die Sequenz dT<sub>10</sub> aufgebaut. Das dT<sub>10</sub> - Oligonukleotid ist mit seinem 5'-Ende auf der Oberfläche verankert, das 3'-OH steht für eine Enzymreaktion frei zur Verfügung. Das abgebildete Fluoreszenz-Image wurde nach Hybridisierung des Chips mit Cy5-markiertem dA<sub>16</sub> erhalten. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 11 zeigt das Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips der zur Bestimmung der Bestrahlungszeit für die von 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Schutzgruppe verwendet wurde. Von links nach rechts wurde mit 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 min ein oberflächengebundener 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Baustein bestrahlt. Im Anschluss wurde die erfolgte Abstraktion der von 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Gruppen durch permanentes Labeling mit einem Cy5-Farbstoff sichtbar gemacht. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 12 Polymerase-Reaktion auf einem DNA-Chip (Sequenz: dT<sub>9</sub>), der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] hergestellt wurde. Die Polymerase-Reaktion (Primer Extension) wurde mit den abgebildeten Nucleotid-Sequenzen durchgeführt

und deren Erfolg mittels Hybridisierung sichtbar gemacht. Gezeigt sind die Fluoreszenz-Images, die nach gleichzeitiger Hybridisierung mit Cy5-markierten dA<sub>16</sub> und Cy3-markiertem d(CTATAGTGAGTCGTA) erhalten wurden. Mit Cy5-dA<sub>16</sub> wird die mittels licht-gesteuerter Synthese auf der Trägeroberfläche erzeugte dT<sub>9</sub>-Sequenz detektiert; mit Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTA) wird ausschließlich die Kettenverlängerung des oberflächengebundenen Primers durch die Polymerase-Reaktion detektiert.

Fig. 13 Ligase-Reaktion auf einem DNA-Chip (Sequenz: dT<sub>10</sub>), der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Die Ligase-Reaktion wurde mit den abgebildeten Nucleotid-Sequenzen durchgeführt und deren Erfolg mittels Hybridisierung sichtbar gemacht. Gezeigt sind die Fluoreszenz-Images, die nach gleichzeitiger Hybridisierung mit Cy5-markiertem dA<sub>16</sub> und Cy3-markiertem d(CTATAGTGAGTCGTA) erhalten wurden. Mit Cy5-dA<sub>16</sub> wird die mittels lichtgesteuerter Synthese auf der Trägeroberfläche erzeugte dT<sub>10</sub>-Sequenz detektiert; mit Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTA) wird ausschliesslich die Anknüpfung der Sequenz d(5'-Phosphat-AATACGACTCACTA-TAG) durch die Ligase-Reaktion detektiert. In der Mitte der Arrays wurde als Negativkontrolle keine Ligasereaktion durchgeführt und daher ist dieser Spot auch nur im Cy5-Kanal und nicht im Cy3-Kanal sichtbar.

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Die Reaktionsschemata zur Herstellung der nachfolgenden Verbindungen ist in den Figuren 3-7 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird.

**Reagenzien:** DMTr-geschützte Nucleoside, 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropyl-phosphoro-diamidite und 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphor-imidochloridit von Proligo (Hamburg, Germany). Alle anderen Reagenzien von Fluka (Ulm, Germany)

**Beispiel 1:**            2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (1)  
Zu 5 ml Diphosgen (41.4 mmol) in 10 ml absolutem THF werden unter Stickstoffatmosphäre bei 0°C über eine Kanüle eine Lösung bestehend aus 7.2 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (39.7 mmol) und 4.4 ml N-Methylmorpholin (39.7 mmol) in 15 ml absolutem THF langsam zugegeben. Nach 1 hr Rühren bei 0°C wird vom gebildeten Niederschlag abgesaugt und das Filtrat am Hochvakuum abgezogen. Man erhält 6.91g von 1 in Form eines braunen Öls (71 %).

Beispiel 2: N<sup>3</sup>-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methyl-imidazoliumchlorid (2)

1.07 ml 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (**1**) (4.4 mmol) werden langsam zu einer Lösung von 1.24 ml N-Methylimidazol (14.7 mmol) in 40 ml Dichloromethan über Molsieb 4Å bei 0°C zugetropft. Nach 30 min Rühren im Eisbad wird diese Lösung direkt mit 1.2 Äquivalenten der 5'-O-geschützten Nucleosidbausteine zur Acylierung eingesetzt werden.

Beispiel 3: 1-Methyl-3-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-imidazoliumtriflat (2a)

Unter Stickstoffatmosphäre werden 2.19 g N,N-Carbonyldiimidazol (13.5 mmol) in 40 ml absolutem Dichlormethan und 10 ml absolutem Nitromethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Es werden 3 ml Trifluormethansulfonsäuremethylester (27 mmol) zugegeben und bei 0°C gerührt. Nach 30 min wird eine Lösung bestehend aus 1.22 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (6.75 mmol) in 10 ml absolutem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionslösung kann nach 1 hr Reaktionszeit direkt mit 1.2 Äquivalenten der 5'-O-geschützten Nucleosidbausteine zur Acylierung eingesetzt werden.

**Beispiel 4:** N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)- 5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-deoxycytidin (8)

Zu 1.2 equiv N<sup>3</sup>-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methylimidazolium chlorid (2) (3.7 mmol) in 50 ml Dichlormethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 2.27 g N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-desoxycytidin (4) (3.1 mmol) in 20 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-66 % Ethylacetat in Toluol) ergab 2.12 g (74%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) : δ 10.90 (br, NH), 8.04 (2d, H-C(6)), 7.80 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.67 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.47 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.19-7.34 (m, 9H DMTr, 2Hm zu <sup>tert</sup>butyl), 6.99 (2d, H-C(5)), 6.84 (m, 4 H DMTr, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 6.07 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), 4.77 (s, CH<sub>2</sub>O), 4.14-4.35 (m, OCH<sub>2</sub>CH, H-C(4')), 3.70 (m, 2 OCH<sub>3</sub>), 3.51 (m, CHCH<sub>3</sub>), 3.20-3.30 (m, 2 H-C(5')), 2.51 (m, H-C(2')), 2.31 (m, H-C(2')), 1.28 (d, CHCH<sub>3</sub>), 1.24 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> : 927.3816. Gefunden: 927.3826. ESI-MS: 927 (M+H<sup>+</sup>), 950 (M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 2:1) 0.34

**Beispiel 5:** N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)- 5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-deoxycytidin (8)

Zu 1.2 equiv 1-Methyl-3-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]imidazoliumtriflat (2a) (2.8 mmol) in 8 ml Dichlormethan und 2 ml Nitromethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 1.68 g N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-desoxycytidin (4) (2.3 mmol) in 10 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung der Titelverbindung erfolgt über Flash Chromato-



graphie (0-66 % Ethylacetat in Toluol).

R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 2:1) 0.34

**Beispiel 6:**            3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin (11)

Zu 1.2 equiv N<sup>3</sup>-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methylimidazolium chlorid (2) (4.4 mmol) in 30 ml Dichlormethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 2 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin (3) (3.67 mmol) in 20 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit 0.5 % HCl (100 ml) extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Zur organischen Phase wird 10 % Trichloressigsäure (70 ml) in Dichlormethan zugefügt und für 2 min gerührt. Danach wird die tief rote Lösung zweimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-10 % Methanol in Toluol/Ethylacetat (5:4)) ergab 1.53 g (93%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) : δ<sub>11.26</sub> (br, NH), 7.82 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.69 (m, H-C(6), 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.49 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 6.11 (m, H-C(1')), 5.09 (m, H-C(3'), HO-C(5')), 4.33 (m, CHCH<sub>2</sub>-O), 3.96 (m, H-C(4')), 3.59 (2m, 2 H-C(5')), 3.52 (m, CHCH<sub>2</sub>O), 2.24 (m, 2 H-C(2')), 1.77 (2s, CH<sub>3</sub>), 1.29 (d, CHCH<sub>3</sub>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> : 450.1512. Gefunden: 450.1524. ESI-MS: 450 (M+H<sup>+</sup>), 472 (M+Na<sup>+</sup>), 899 (2M+H<sup>+</sup>), 921 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:2) 0.21

**Beispiel 7:**            N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxycytidin (12)

Wie beschrieben für 11 mit N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxycytidin (4) (5 g, 6.93 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (2.71 g, 8.32 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung durch Ausfällen mit Toluol ergab 3.16 g (73%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) : δ<sub>10.87</sub> (br, NH), 8.29 (d, H-C(6)), 7.82 (m, 1H

o zu NO<sub>2</sub>), 7.69 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.48 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.29 (m, 2H m zu <sup>tert</sup>butyl), 7.13 (d, H-C(5)), 6.84 (m, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 6.08 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), HO-C(5')), 4.77 (s, CH<sub>2</sub>O), 4.33 (m, OCH<sub>2</sub>CH), 4.10 (m, H-C(4')), 3.62 (m, 2 H-C(5')), 3.53 (m, CHCH<sub>3</sub>), 2.48 (m, H-C(2')), 2.21 (m, H-C(2')), 1.29 (d, CHCH<sub>3</sub>), 1.24 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>: 625.2509. Gefunden: 625.2495. ESI-MS: 625 (M+H<sup>+</sup>), 647 (M+Na<sup>+</sup>), 1249 (2M+H<sup>+</sup>), 1271 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:4) 0.50

**Beispiel 8:** N6-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin (13)

Wie beschrieben für 11 mit N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxyadenosin (5) (2.73 g, 3.67 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (1.31 g, 4.40 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung über Flash Chromatographie (0-4 % Methanol in Toluol/Ethylacetat (1:1)) ergab 2.05 g (86%) der Titelverbindung. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO) : δ 10.78 (br, NH), 8.66 (m, H-C(2), H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.70 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.49 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.30 (m, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 6.89 (m, 2H m zu <sup>tert</sup>butyl), 6.43 (m, H-C(1')), 5.28 (m, H-C(3')), 5.14 (m, HO-C(5')), 4.98 (s, CH<sub>2</sub>O), 4.34 (m, OCH<sub>2</sub>CH), 4.12 (m, H-C(4')), 3.60 (m, 2 H-C(5')), CHCH<sub>3</sub>), 3.02 (m, H-C(2')), 2.57 (m, H-C(2')), 1.31 (d, CHCH<sub>3</sub>), 1.24 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>: 649.2621. Gefunden: 649.2644. ESI-MS: 649 (M+H<sup>+</sup>), 671 (M+Na<sup>+</sup>), 1297 (2M+H<sup>+</sup>), 1319 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.17

**Beispiel 9:** N2-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyguanosin (14)

Wie beschrieben für 11 mit N2-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxyguanosin (6) (5 g, 6.58 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (2.57 g, 7.9 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung über Flash Chromatographie (0-10 % Methanol in Toluol/Ethylacetat

(1:1)) ergab 3.53 g (81%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) :  $\delta$  11.74 (br, 2 NH), 8.23 (2s, H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.70 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.49 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.30 (m, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 6.89 (m, 2H m zu <sup>tert</sup>butyl), 6.18 (m, H-C(1')), 5.13 (m, H-C(3')), 5.06 (m, HO-C(5')-), 4.81 (2s, CH<sub>2</sub>O), 4.34 (m, OCH<sub>2</sub>CH), 4.04 (m, H-C(4')), 3.55 (m, 2 H-C(5'), CHCH<sub>3</sub>), 2.83 (m, H-C(2')), 2.49 (m, H-C(2')), 1.29 (d, CHCH<sub>3</sub>), 1.25 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 665.2570. Gefunden: 665.2582. ESI-MS: 665 (M+H<sup>+</sup>), 687 (M+Na<sup>+</sup>), 1329 (2M+H<sup>+</sup>), 1351 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Ethylacetat/Methanol 3:1) 0.18

**Beispiel 10:** 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (15)

Zu einer Lösung aus 1.53 g 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin (11) (3.4 mmol) in 15 ml Acetonitril werden 1.2 ml 2-Cyanoethyl-N,N,N,N-tetraisopropylphosphorodiamidit (3.98 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (3.4 ml, 1.7 mmol) in Acetonitril zugefügt. Nach 1 hr Rühren wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan (100 ml) verdünnt und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl (100 ml) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.94 g (88%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) :  $\delta$  11.26 (br, NH), 7.82 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.69 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>), 7.47-7.55 (m, H-C(5), 1H m zu NO<sub>2</sub>), 6.08 (m, H-C(1')), 5.09 (m, H-C(3')), 4.27-4.35 (m, OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.12 (m, H-C(4')), 3.70-3.83 (m, 2 H-C(5'), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.49-3.59 (m, 3 CHCH<sub>3</sub>), 2.75 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.29 (m, 2 H-C(2')), 1.78 (m, CH<sub>3</sub>), 1.28 (d, CH<sub>3</sub>), 1.09-1.24 (m, 7 CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-NMR (DMSO) :  $\delta$  149.36, 149.33, 149.29

ESI-MS: 649 (M+H<sup>+</sup>), 672 (M+Na<sup>+</sup>), 1321 (2M+Na<sup>+</sup>). HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P: 650.2590. Gefunden: 650.2576. R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.37

**Beispiel 11:** N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxycytidin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (16)

Wie beschrieben für 15, mit N4-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]-2'-desoxycytidin (12) (1.51 g, 2.41 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (0.9 ml, 2.84 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (2.6 ml, 1.3 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.61 g (81%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) :  $\delta$  10.90 (br, NH), 8.14 (m, H-C(6)), 7.82 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.69 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>, 7.48 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.29 (m, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 7.14 (m, H-C(5)), 6.83 (m, 2H m zu <sup>tert</sup>butyl), 6.07 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), 4.77 (s, OCH<sub>2</sub>), 4.30 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, H-C(4')), 3.75 (m, 2 H-C(5'), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.55 (m, 3 CHCH<sub>3</sub>), 2.73 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.55 (m, H-C(2')-), 2.25 (m, H-C(2')), 1.29 (m, CH<sub>3</sub>), 1.15 (m, 7 CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-NMR (DMSO) :  $\delta$  149.35. HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>P: 825.3587. Gefunden: 825.3568. ESI-MS: 825 (M+H<sup>+</sup>), 847 (M+Na<sup>+</sup>), 1649 (2M+H<sup>+</sup>), 1671 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.43

**Beispiel 12:** N6-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (17)

Wie beschrieben für 15, mit N6-((4-<sup>tert</sup>butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin (13) (1.90 g, 2.93 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (1.2 ml, 3.78 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (2.9 ml, 1.45 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.9 g (65%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) :  $\delta$  11.70 (br, NH), 8.64 (m, H-C(2), H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.71 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>, 7.48 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.29 (m, 2H o zu <sup>tert</sup>butyl), 6.88 (m, 2H m zu

*tert*-butyl), 6.45 (m, H-C(1')), 5.33 (m, H-C(3')), 4.98 (s, OCH<sub>2</sub>-), 4.36 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.24 (m, H-C(4')), 4.78 (m, 2 H-C(5')), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.53 (m, 3 CHCH<sub>3</sub>), 3.12 (m, H-C(2')), 2.74 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN-), 2.60 (m, H-C(2')), 1.30 (d, CH<sub>3</sub>), 1.11 (m, 7 CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-NMR (DMSO) : δ<sub>149.24</sub>, 149.20, 149.16. HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>P: 849.3700. Gefunden: 849.3723. ESI-MS: 849 (M+H<sup>+</sup>), 871 (M+Na<sup>+</sup>), 1697 (2M+H<sup>+</sup>), 1719 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.53

**Beispiel 13:** N2-((4-*tert*-butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyguanosin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (18)

Wie beschrieben für 15, mit N2-((4-*tert*-butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]-2'-desoxyguanosin (14) (1.0 g, 1.50 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (0.9 ml, 2.84 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (1.75 ml, 0.87 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (33-66 % Aceton in Petrolether) ergab 1.19 g (91%) der Titelverbindung.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) : δ<sub>11.45</sub> (br, 2 NH), 8.15 (m, H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO<sub>2</sub>), 7.70 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>, 1H p zu NO<sub>2</sub>, 7.49 (m, 1H m zu NO<sub>2</sub>), 7.29 (m, 2H o zu *tert*-butyl), 6.88 (m, 2H m zu *tert*-butyl), 6.19 (m, H-C(1')), 5.23 (m, H-C(3')), 4.79 (m, OCH<sub>2</sub>), 4.36 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.20 (m, H-C(4')), 3.73 (m, 2 H-C(5')), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.55 (m, 3 CHCH<sub>3</sub>), 2.87 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.76 (m, H-C(2')), 2.57 (m, H-C(2')), 1.30 (d, CH<sub>3</sub>), 1.15 (m, 7 CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-NMR (DMSO) : δ<sub>149.46</sub>, 149.41. HRMS (FAB, M+H<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>P: 865.3649. Gefunden: 865.3660. ESI-MS: 865 (M+H<sup>+</sup>), 887 (M+Na<sup>+</sup>), 1751 (2M+Na<sup>+</sup>). R<sub>f</sub> (Toluol/Ethylacetat/Methanol 5:4:1) 0.39

**Beispiel 14:** N-Methyl-N3-[(6-nitroveratryl)oxycarbonyl]-imidazoliumchlorid (19)

Bei 0°C werden zu 1.44 ml N-Methylimidazol (18.1 mmol) und

Molekularsieb 4Å in 100 ml absolutem Dichlormethan 2 g Chlorameisensäure-6-nitroveratrylester (7.25 mmol; Firma Fluka Ulm) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 15 Minuten bei 0°C gerührt. Diese Reaktionslösung wird direkt für Acylierungen eingesetzt.

**Beispiel 15:** 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin  
(21)

Eine Lösung von 1.97 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin (3.62 mmol) in 18 ml absolutem Dichlormethan und 2 ml absolutem Pyridin werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluss von Licht zu einer N-Methyl-N3-[(6-nitroveratryl)oxycarbonyl]-imidazoliumchlorid-Acylierungsreaktion (19) (hergestellt aus 7.25 mmol Chlorameisensäure-6-nitroveratrylester) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird abgedunkelt über Nacht bei 4°C gerührt. Das Molekularsieb wird abgetrennt und die organische Phase zweimal gegen gesättigte NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) extrahiert. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> werden der organischen Phase 200 ml einer 10 % Trichloressigsäure in Dichlorethan zugefügt und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Die stark rot gefärbte Lösung wird zweimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> (200 ml) extrahiert, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (66-80% Ethylacetat in Toluol) ergab 1.153 g der Titelverbindung (66 % Ausbeute)

**Beispiel 16:** 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-  
thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (22)

Unter Stickstoffatmosphäre werden 1g 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin (21) (2.08 mmol) in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Es werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluss von Licht 0.22 ml N-Methylmorpholin (2 mmol) und 0.24 ml 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphor-imido-chloridit (1.1 mmol) zugefügt. Nach 1 hr Rühren wird gegen

gesättigte  $\text{NaHCO}_3$  (200 ml), dann gegen gesättigte  $\text{NaCl}$  (200 ml) extrahiert, die organische Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (50-66% Ethylacetat in Toluol), ergab 0.74 g der Titelverbindung (55 % Ausbeute).

**Beispiel 17: Herstellung von DAN-Chips mit Hilfe von monomeren Bausteinen vom Typ 3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-5'-Phosphoramidit**

Die DNA-Chip-Synthese wurde analog dem Verfahren von Fodor et al. (Science 1991, 251, S 767 ff) unter Verwendung von Masken bzw. maskenfrei, wie bereits in den deutschen Patentanmeldungen DE 198 58 440.7 bzw. DE 199 62 803.3 gezeigt, auf einer Glasoberfläche als Träger durchgeführt.

Die Bestrahlung zum Zwecke der Abstraktion der 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-Gruppe wird zweckmäßig unter Zusatz einer Base während der Bestrahlung durchgeführt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 198 58 440.7 verwiesen. Der Reaktionsablauf ist schematisch in Fig. 8 gezeigt. Als monomere Bausteine wurde die erfindungsgemäße Verbindung 3'-O-[(2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl)-thymidin-5'-O[(-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] eingesetzt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 199 15 867.3 verwiesen. Der angewendete Zyklus und die speziellen Synthesebedingungen sind in der deutschen Patentanmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt, worauf hier Bezug genommen wird. Die Ankoppelung des Nucleotidstranges erfolgt über das 5'-Ende an die feste Trägerphase. Somit ist nach beendeter Synthese und abschließender Schutzgruppenabspaltung des 3'-OH-Ende frei verfügbar. Dadurch können Enzymreaktionen, die ein freies 3'-Ende verlangen (Polymerase-Reaktionen, Ligase-Reaktionen, PCR, cDNA-Synthese, Sequenzierungen, ...) an diesen Bio-Chips durchgeführt werden.

In Fig. 9 ist das Fluoreszenz-Image des hergestellten Chips mit  $d(T_9)$  nach Hybridisierung mit Cy5-markiertem  $d(A_{16})$  zu sehen. Das Muster entspricht der angewendeten Maske, d.h. es

war eine erfolgreiche DNA-Chip-Synthese möglich.

**Beispiel 18: Herstellung von DNA-Chips mit Hilfe von monomeren Bausteinen vom Typ 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl-5'-Phosphoramidit**

Die DNA-Chip-Synthese wurde analog dem Verfahren von Fodor et al. (Science 1991, 251, S767 ff) unter Verwendung von Masken bzw. maskenfrei, wie bereits in den deutschen Patentanmeldungen DE 198 58 440.7 bzw. DE 199 62 803.3 gezeigt, auf einer Glas-oberfläche als Träger durchgeführt.

Die Bestrahlung zum Zwecke der Abstraktion der 3'-O-(6-Nitroveratryl)-Gruppe wird zweckmäßig ohne Zusatz von Lösungsmitteln, also "trocken" durchgeführt. Als monomerer Baustein wurde die erfindungsgemäße Verbindung 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit eingesetzt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 100 03 631.7 verwiesen, worauf hier Bezug genommen wird. Die Ankoppelung des Nucleotidstranges erfolgt über das 5'-Ende an die feste Trägerphase. Somit ist nach beendeter Synthese und abschließender Schutzgruppenabspaltung das 3'-OH-Ende frei verfügbar. Dadurch können Enzymreaktionen, die ein freies 3'-Ende verlangen (Polymerase-Reaktionen, Ligase-Reaktionen, PCR, cDNA-Synthese, Sequenzierungen, ...) an diesen Bio-Chips durchgeführt werden.

In Fig. 10 ist das Fluoreszenz-Image des hergestellten Chips mit d(T<sub>10</sub>) nach Hybridisierung mit Cy5-markiertem d(A<sub>16</sub>) zu sehen. Das Muster entspricht der angewendeten Maske, d.h. es war eine erfolgreiche DNA-Chip-Synthese möglich.



**Beispiel 19:** Durchführung einer Polymerase-Reaktion (Primer Extension) auf einem DNA-Chip, der mit Hilfe monomerer Bausteine vom Typ 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit hergestellt wurde

Auf den dT<sub>9</sub>-DNA-Chip wird für die Durchführung der Enzym-Reaktion eine 25 µl Reaktionskammer (EasiSeal, Hybaid) über den Array fixiert.

1 µl des Templats [d(CTATAGTGAGTCGTATTAAAAAAAAAA), 100 µM] werden in 9,5 µl autoklaviertem Wasser für 5 min bei 95°C denaturiert und nach 3 min auf Eis in die Reaktionskammer gefüllt. Zugegeben werden ferner 12,5 µl des Puffers (20 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM DTT), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und zum Schluß 1 µl des Klenow-Fragments (3'exo+5'exo; 5000 U/ml; New England Biolabs). Nach sorgfältigem Mischen wird die Reaktionskammer verschlossen und die Reaktion über Nacht bei 37°C durchgeführt.

Zur Detektion wird anschließend für 30 sec bei 95°C mit Striping-Buffer (2,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) SDS) gewaschen und dann mit 5'-Cy5-dA16 und 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATT) hybridisiert.

**Beispiel 20:** Durchführung einer Ligase-Reaktion auf einem DNA-Chip, der mit Hilfe monomerer Bausteine vom Typ 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] hergestellt wurde

Auf den dT<sub>10</sub>-DNA-Schip wird für die Durchführung der Enzym-Reaktion eine 25 µl Reaktionskammer (EasiSeal, Hybaid) über den Array fixiert.

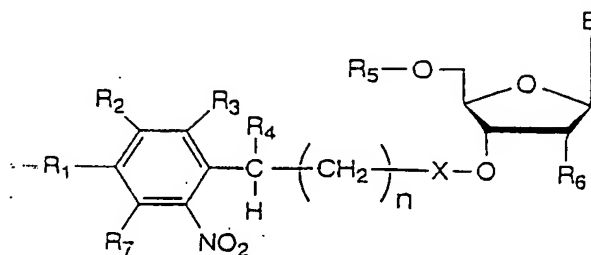
1 µl des Templats [d(CTATAGTGAGTCGTATTAAAAAAAAAA), 100 µM] werden in 17,8 µl autoklaviertem Wasser in die Reaktionskammer eingefüllt. Nach 2 min erfolgt die Zugabe von 1 µl d(5'-Pho-

sphat-AATACGACTCACTATAG) [100  $\mu$ M]. Zugegeben werden nach weiteren 2 min ferner 5  $\mu$ l des Ligase-Puffers (5x; 250 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 5 mM ATP, 125  $\mu$ g BSA/ml) und zum Schluß 0,2  $\mu$ l der T4-DNA-Ligase (400 00 U/ml; New England Biolbas). die Reaktionskammer wird verschlossen und die Reaktion für 1 hr bei 16°C durchgeführt.

Zur Detektion wird anschließend für 30 sec bei 95°C mit Stripping-Buffer (2,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) SDS) gewaschen und dann mit 5'-Cy5-dA16 und 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATT) hybridisiert.

## Patentansprüche

- 1) Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I)



mit

$R^1$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen

$R^2$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

$R^3$  = H, Halogen,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

$R^4$  = H, Halogen,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

$R^5$  = H, Dimethoxytrityl oder eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe

$R^6$  = H, OH, Halogen oder  $\Psi R^8$ , wobei  $\Psi$  = O oder S und  $R^8$  = Alkyl- oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen sowie eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe

$R^7 =$  H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

$n =$  0 oder 1

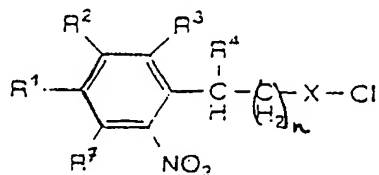
$X =$   $\text{SO}_2$ , OCO, OCS

$B =$  H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von  $B =$  Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine temporäre oder permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der O4-Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

- 2) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Falle von  $R^4 \neq \text{H}$   $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  jeweils H sind.
- 3) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Fall von  $R^2 = \text{OCH}_3$   $R^3 = \text{H}$  ist.
- 4) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1-3, wobei  $R^4 = \text{CH}_3$  ist.
- 5) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden an der Position  $R^5$  eine Phosphitamidgruppe der Formel
 
$$\text{p-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2, \text{ p-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2, \text{ p-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2 \text{ oder } \text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$$
 ist,
 

wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten.
- 6) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 5, wobei die Q-Gruppe Ethyl- oder Isopropyl- ist.

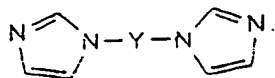
- 7) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1-6, wobei der Rest  $R^8$  in der Gruppe  $\Psi R^8$  an der Position  $R^6$  im Falle von  $\Psi = O$  eine O-Alkyl-, O-Alkenyl-, O-Acetal- oder O-Silylether-Gruppe oder im Fall von  $\Psi = S$  eine O-Alkyl-Gruppe ist.
- 8) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 7, wobei Halogen Cl, Br, I bedeutet.
- 9) Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-Derivaten nach einem der Ansprüche 1-8, wobei man
- (a1) eine Verbindung der allgemeinen Formel (II)



in der  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^7$ ,  $n$  und  $X$  die oben genannte Bedeutung haben,

mit N-Methylimidazol, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin, Triazol oder Tetrazol umgesetzt, oder

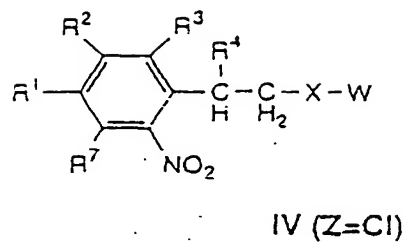
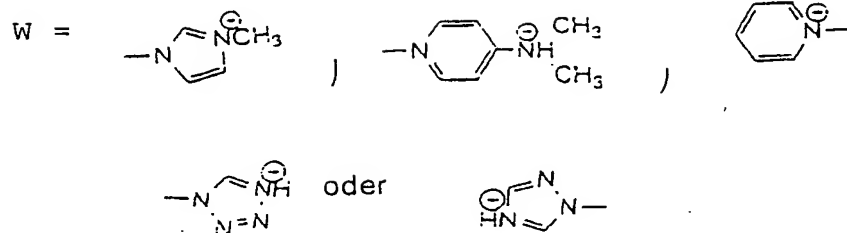
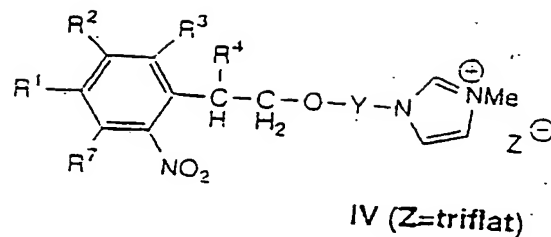
- (a2) eine Verbindung der allgemeinen Formel (V)



$Y = C=O$  oder  $C=S$

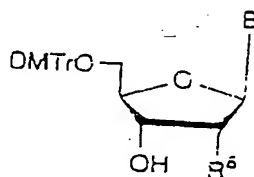
mit einem Methylierungsmittel umgesetzt sowie das erhaltene Produkt mit einem Alkohol reagieren läßt und anschließend

- (b) das in Stufe (a1) oder (a2) gebildete Acylierungsreagenz (IV)

Z<sup>⊖</sup> oder

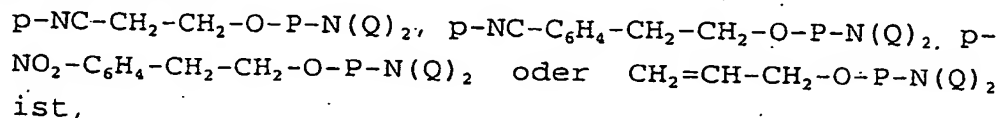
Y = C=O oder C=S

mit einem Nucleosid der allgemeinen Formel (IX)



in der R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und B die oben angegebene Bedeutung haben, reagieren läßt.

- 10) Verfahren nach Anspruch 9, wobei man in der 5'-Stellung der entstandenen Nucleosid-Derivate eine Phosphitamid-Gruppe der Formel



wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können

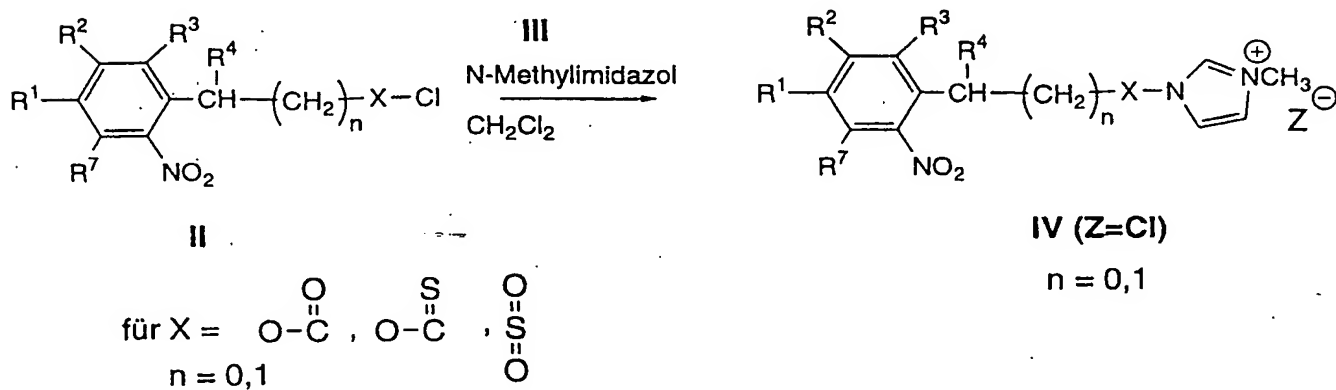
und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten, einführt.

- 11) Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei man Stufe (a1) oder (a2) in einem polaren organischen Lösungsmittel bei Temperaturen zwischen -10 und +10 °C durchführt.
- 12) Verfahren nach Anspruch 11, wobei das polare Lösungsmittel Dichlormethan ist.
- 13) Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Temperatur ca. 0°C beträgt.
- 14) Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei man Stufe (b) in Dichlormethan oder einem Dichlormethan enthaltenden Lösungsmittelgemisch bei Temperaturen von ca. 0°C durchführt.
- 15) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei man in Stufe (b) das in Stufe (a) gebildete Acylierungsmittel in Dichlormethan vorlegt und das Nucleosid zutropft.
- 17) Verwendung der Nucleosid-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Aufbau von Oligonukleotiden oder Nukleinsäure-Chips.
- 18) Nukleinsäure-Chip, bei dem die über eine lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind.
- 19) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Enzymreaktionen, die von einer freien 3'-Hydroxylgruppe ausgehen.
- 20) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Festphasen-gestützte Polymerasereaktionen.

- 21) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Ligasereaktionen.



# Herstellung des Acylierungsreagenzes für X= SO<sub>2</sub>, OCO, OCS:



## alternativ für X = OCO, OCS:

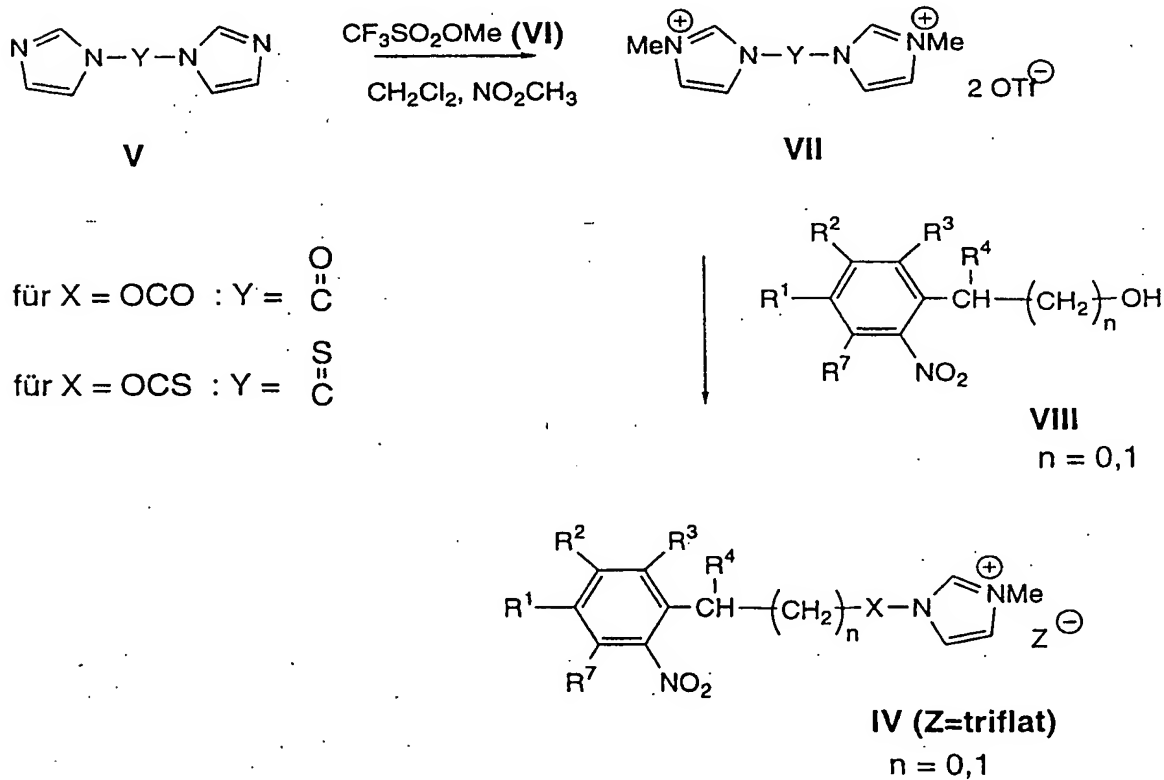
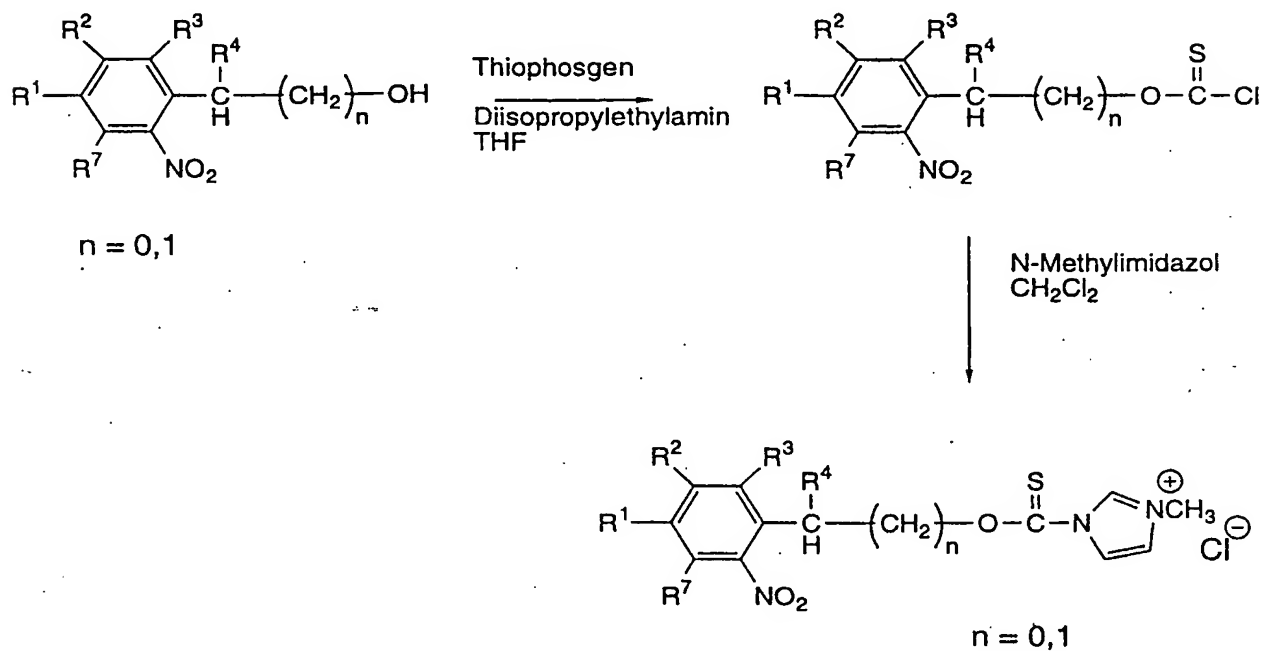


Fig. 1



### Herstellung des Acylierungsreagenzes für $X=OCS$ :



alternativ :

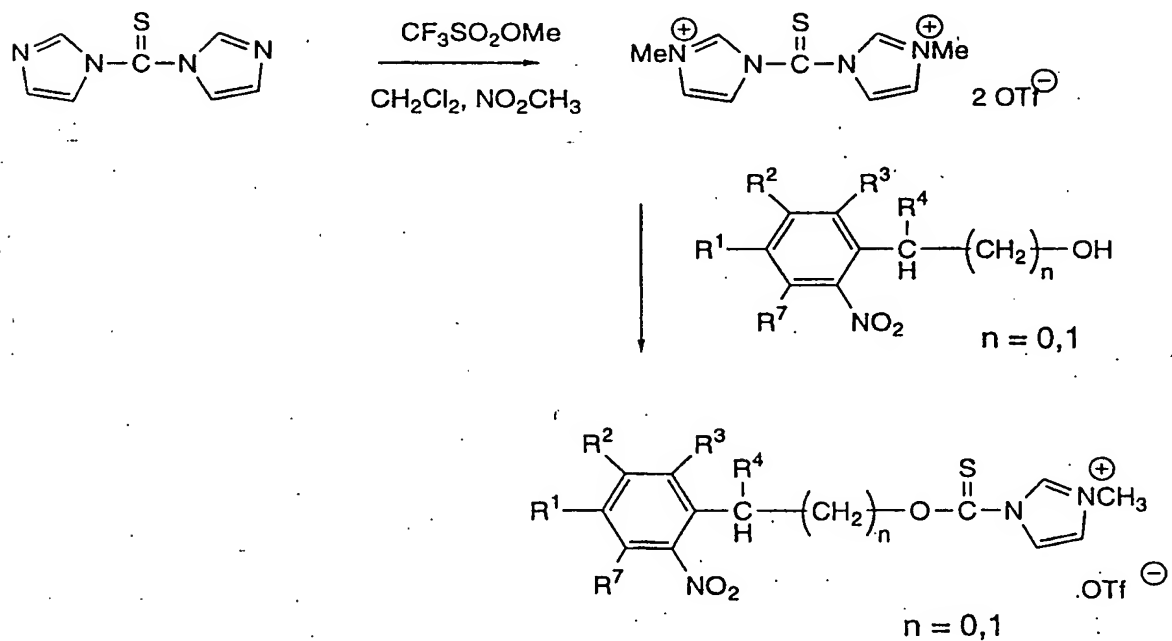


Fig. 1b

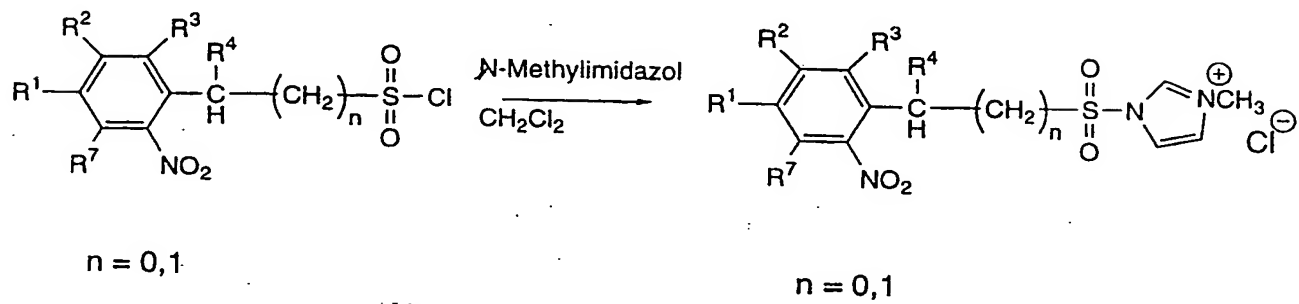
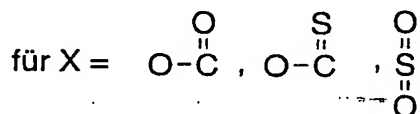
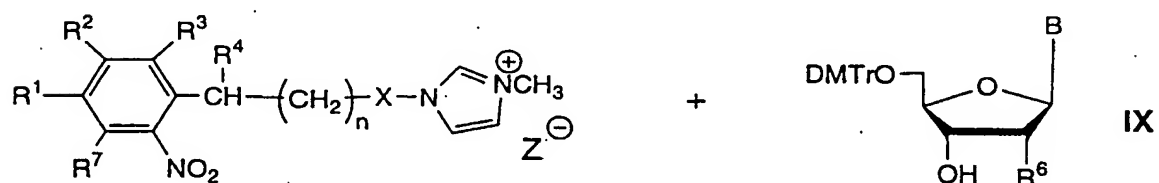
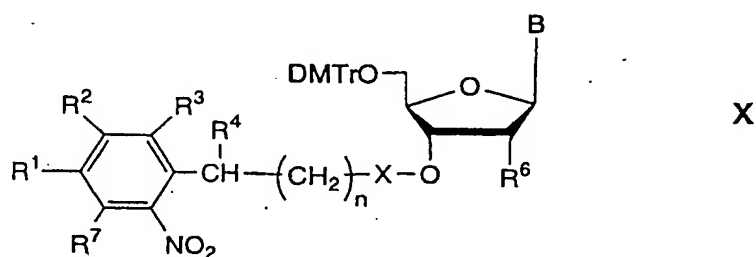
Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X=SO_2$  :

Fig. 1c

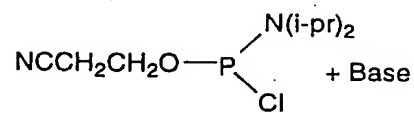
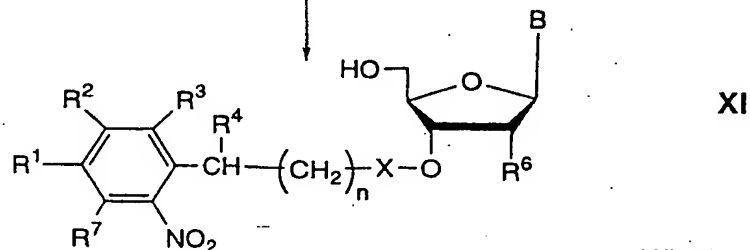
**Syntheseplan : Umsetzung des Acylierungsreagenzes**

(IV ; Z = Cl, OTf)

Molekularsieb  
N-Methylimidazol



Säure



oder

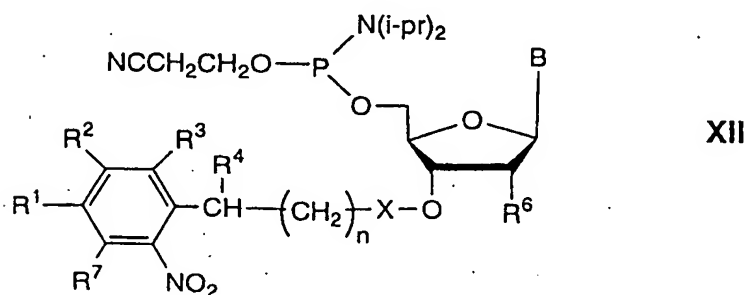
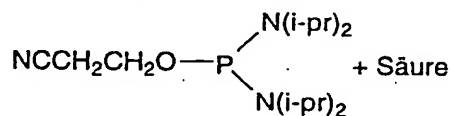


Fig. 2

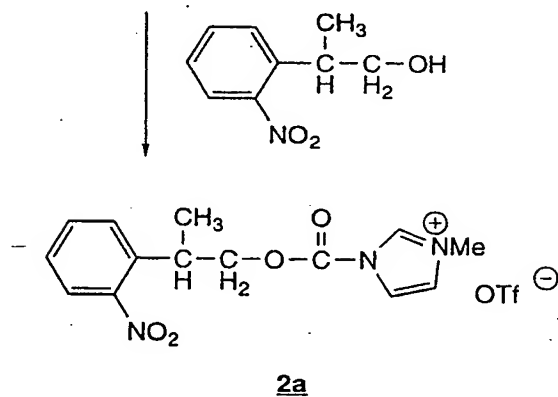
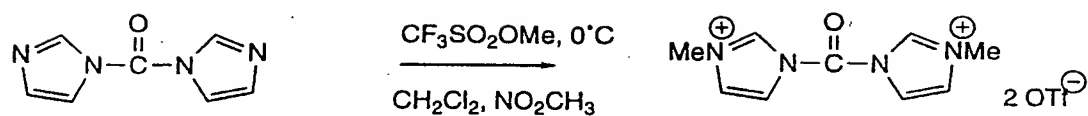
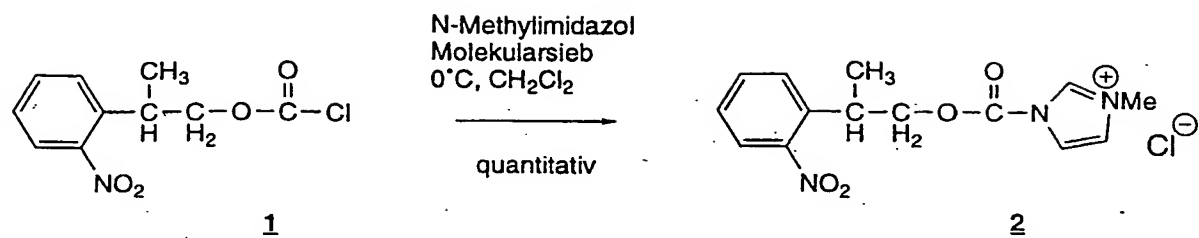
**Beispiele :**

Fig. 3

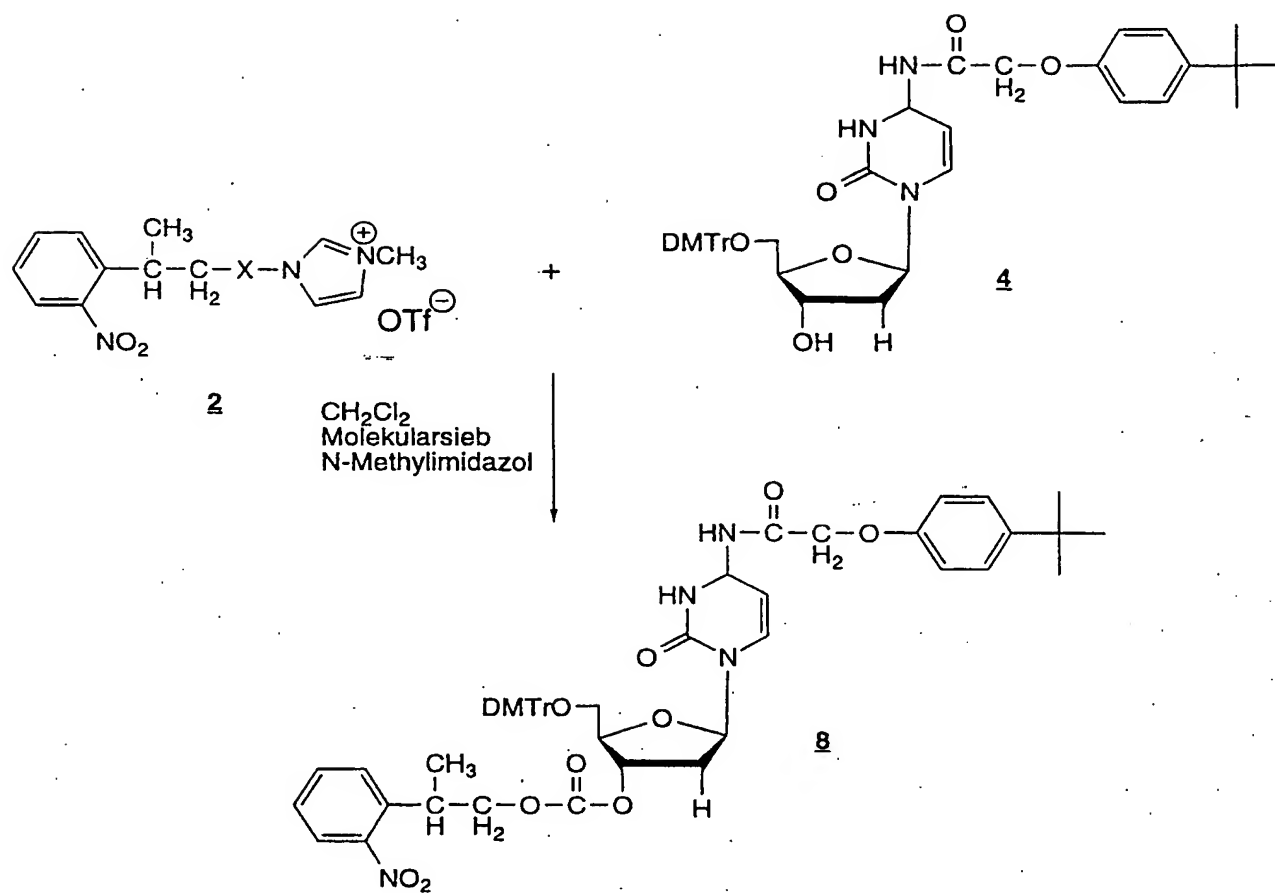
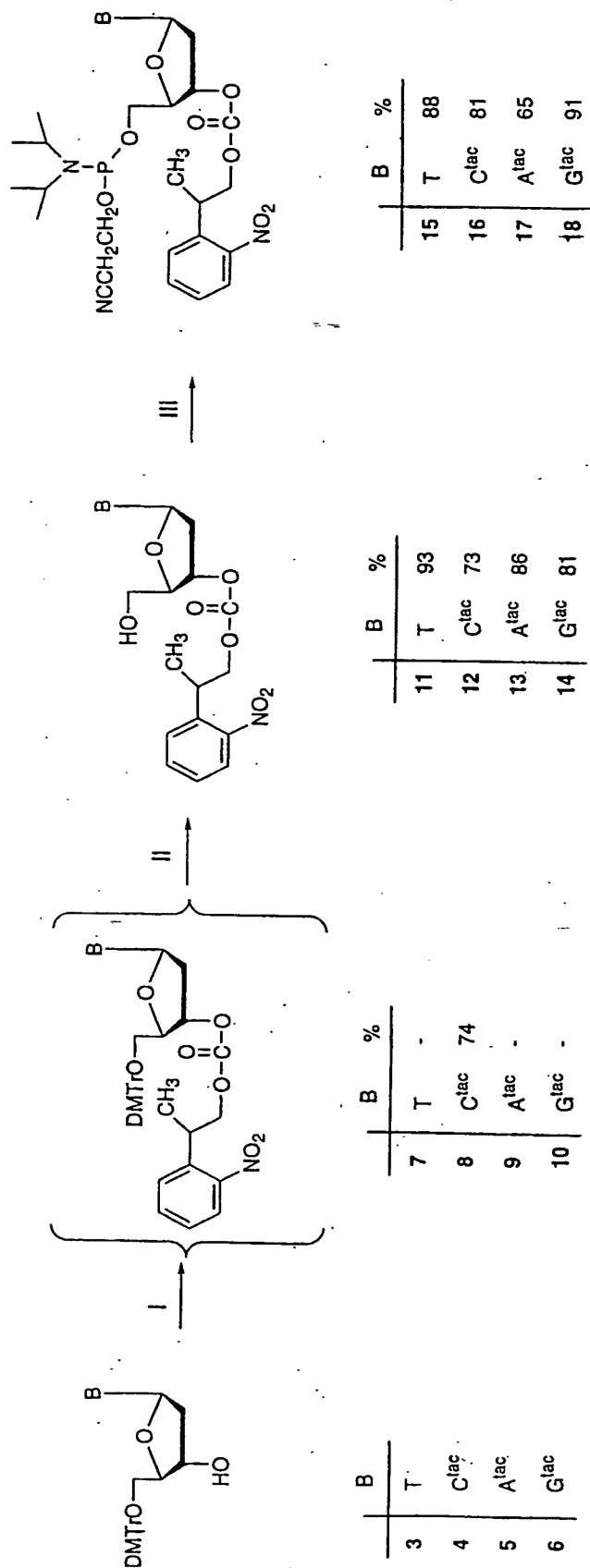
**Beispiele**

Fig. 4

8/16

I : 2, N-Methylimidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>II : Trichloressigsäure, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

III : 2-Cyanoethyl N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit, Pyridin Hydrochlorid, Acetonitril

Fig. 5



9/16

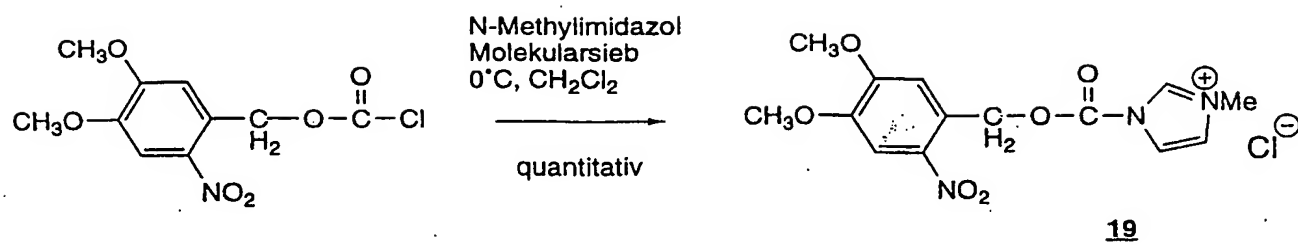
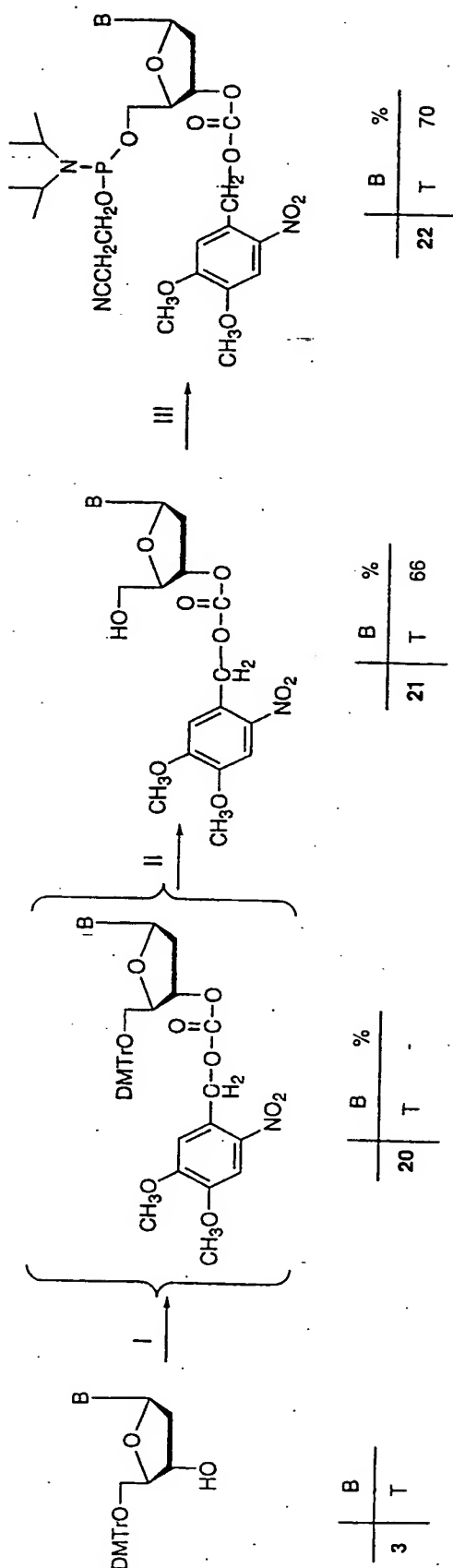
**Beispiele :**

Fig. 6

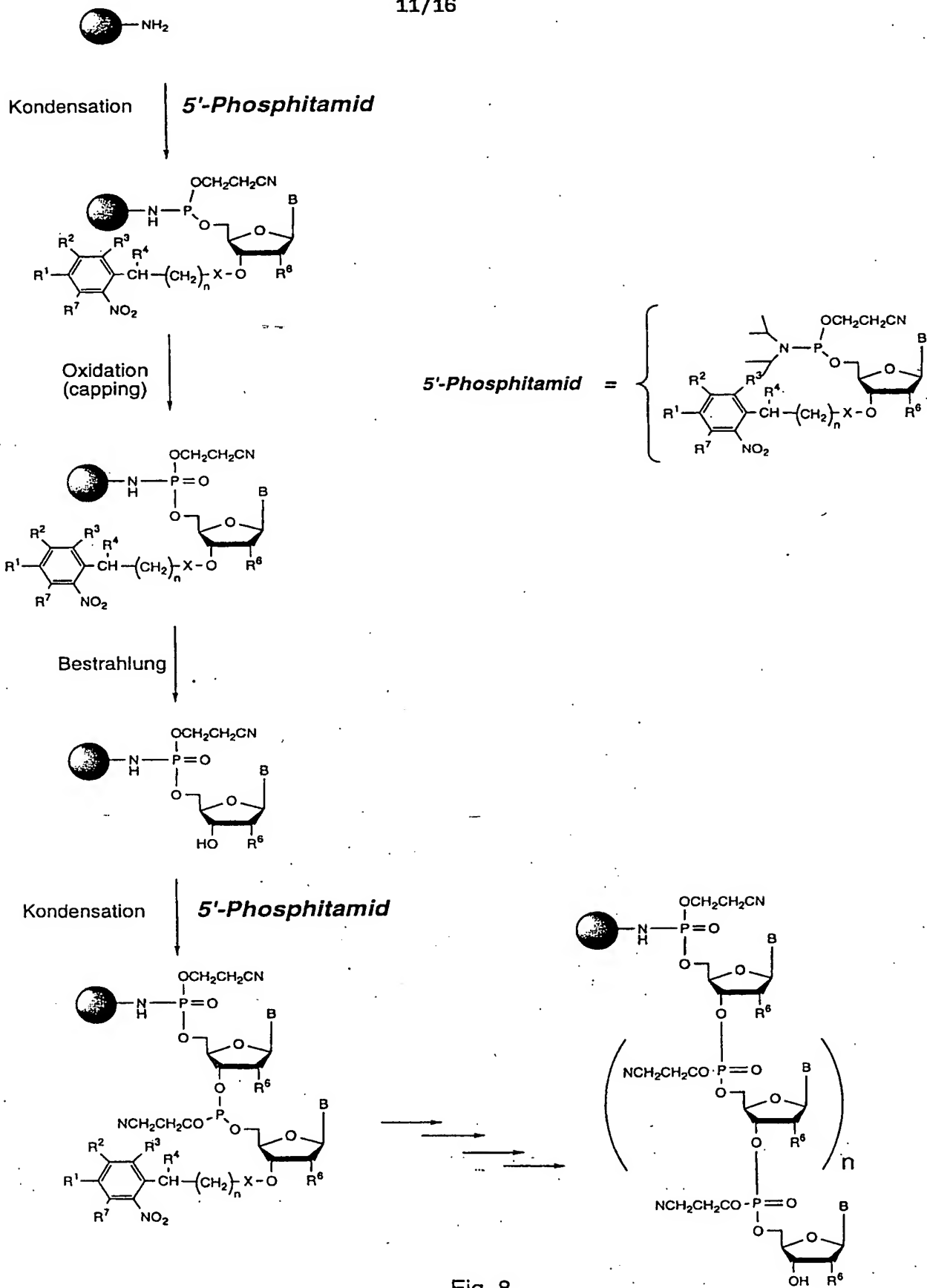
10/16



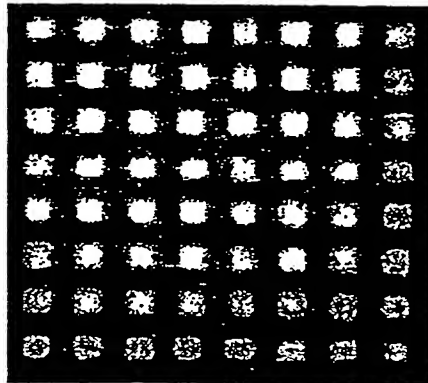
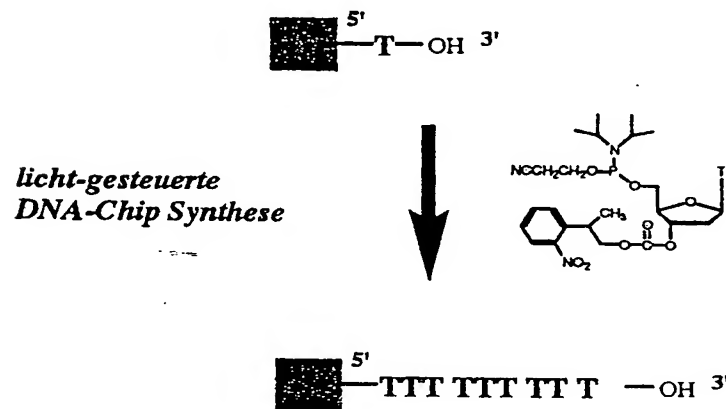
I : 19, N-Methylimidazol,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 II : Trichloressigsäure,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 III : (2-Cyanoethyl)-N,N'-diisopropylphosphor-imidochloridit, Ethyldiisopropylamin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Fig. 7

11/16



12/16  
Synthese von DNA-Chips :



### Chip-Synthese

Detektion durch Hybridisierung mit :  
5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

Fig.9

BEST AVAILABLE COPY



# Synthese von DNA-Chips : *Bestimmung der Belichtungszeit*

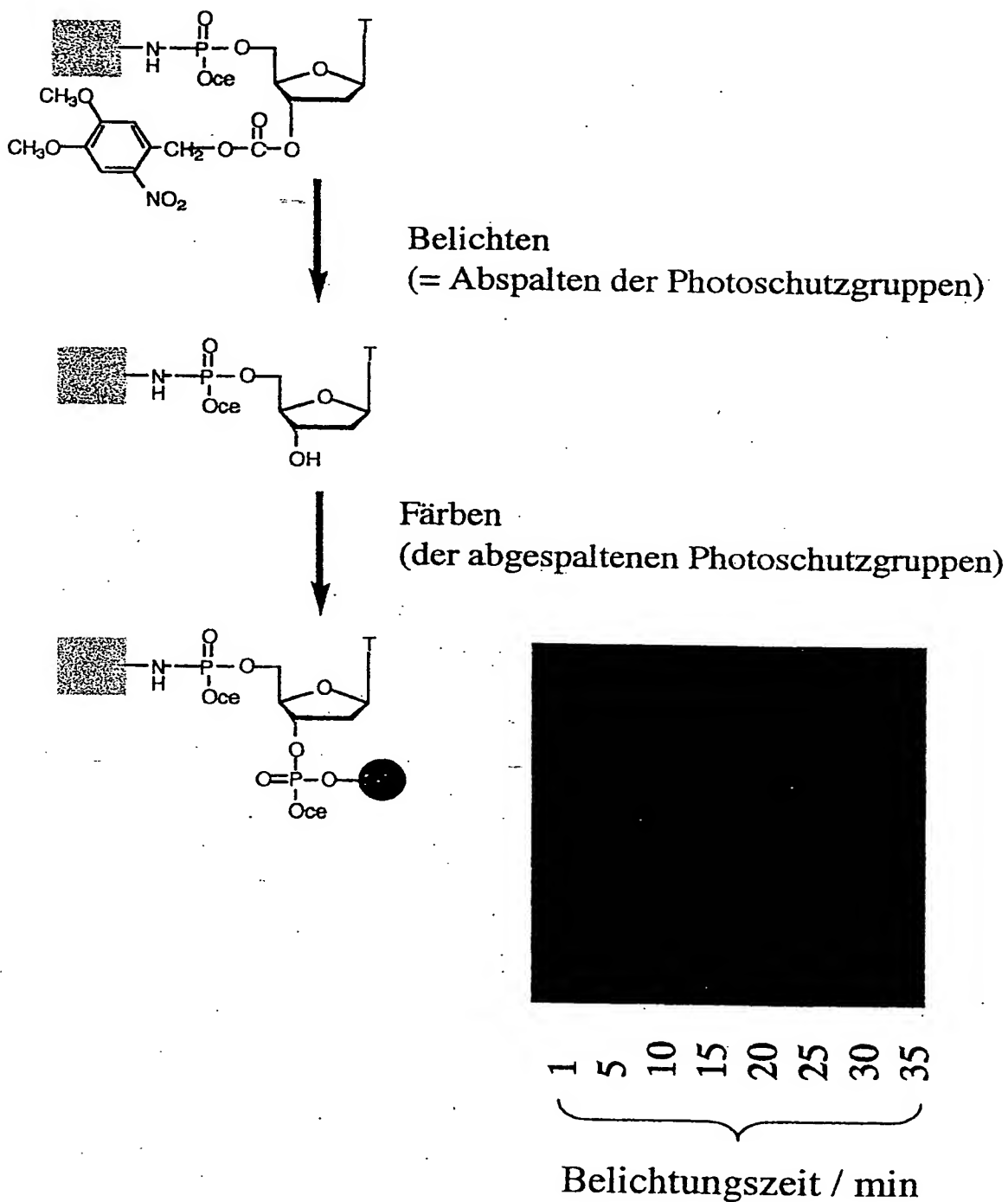
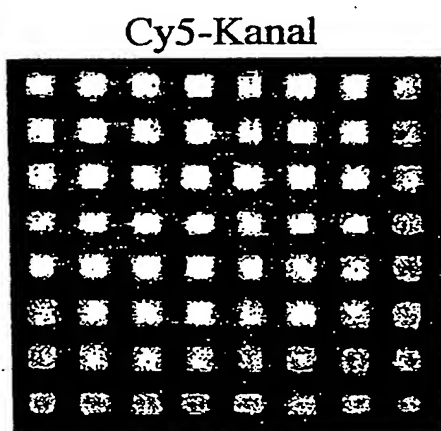
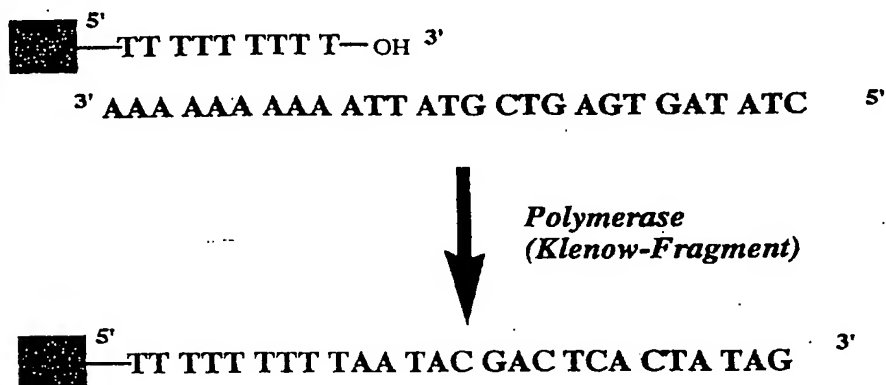


Fig.11

BEST AVAILABLE COPY

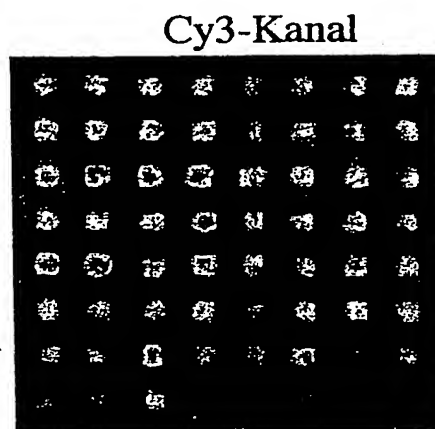
# Enzymatische Reaktion auf DNA-Chips :

## *Polymerase* (Primer Extension)



Chip-Synthese

(a)



Polymerase

(b)

Detektion durch Hybridisierung mit :

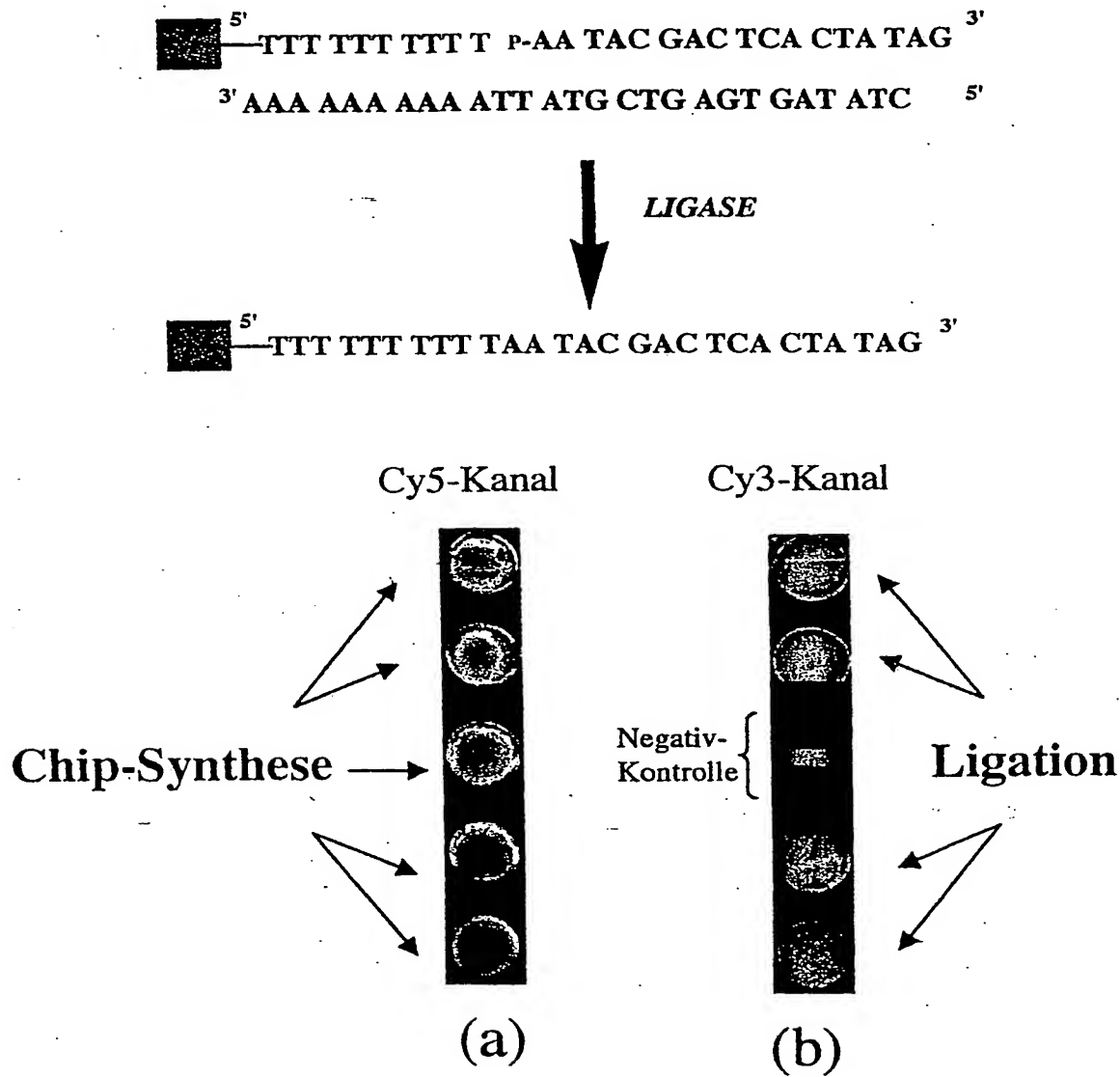
(a) 5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

(b) 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATTA)

Fig. 12

BEST AVAILABLE COPY

# Enzymatische Reaktion auf DNA-Chips : Ligase



Detektion durch Hybridisierung mit :  
 (a) 5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)  
 (b) 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATTA)

Fig. 13

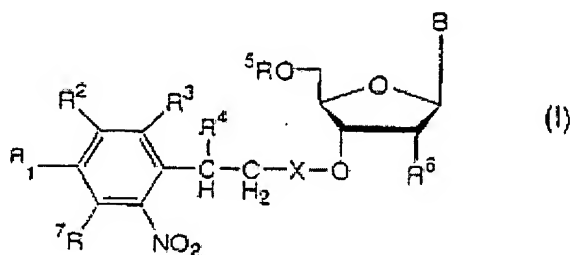


# New nucleoside derivatives with photolabile protecting groups, useful in oligonucleotide synthesis, particularly on solid phases, e.g. for hybridization testing

**Patent number:** DE19915867  
**Publication date:** 2000-10-19  
**Inventor:** BEIER MARKUS (DE); HOHEISEL JOERG (DE)  
**Applicant:** DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE)  
**Classification:**  
 - international: C07H19/02; C07H21/00  
 - european: C07B61/00L, C07H19/06, C07H19/16, B01J19/00C, C07H19/10E, C07H19/20, C07H21/00C4, C07H21/00F  
**Application number:** DE19991015867 19990408  
**Priority number(s):** DE19991015867 19990408

## Abstract of DE19915867

New nucleoside derivatives (I) with photolabile protecting groups. Nucleoside derivatives of formula (I) are new: R<1>-R<4> and R<7> = H, NO<sub>2</sub>, CN, halo, 1-4C alkyl, alkoxy or alkoxyalkoxy, optionally substituted aryl or 2-5C aliphatic acyl; R<5> = H, dimethoxytrityl or a conventional protecting group or a conventional functional group for preparation of a protecting group; R<6> = H, OH or YR<8>; Y = O or S; R<8> = 1-4C alkyl or alkoxyalkyl, optionally substituted aryl, 2-5C aliphatic acyl or a conventional protecting group; n = 0 or 1; X = sulfonyl, OCO or OCS; B = H, adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil, 2,6-diaminopurin-9-yl, hypoxanthin-9-yl, 5-methylcytosin-1-yl, 5-amino-4-imidazole-carboxylic acid-1- or 3-yl, and if adenine, guanine or cytosine, then the primary amino may be protected, temporarily or permanently, and if thymine or uracil the O4 position may be protected permanently. Independent claims are included for: (1) method for preparing (I); and (2) nucleic acid chips in which oligonucleotides, produced by light-controlled synthesis, are attached via their 3'-ends to a solid phase.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**